

L2 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2008

THOMSON REUTERS on STN

Full  
Text

AN 2002-077302 [11] WPINDEX

CR 2002-077303

DNC C2002-023269 [11]

TI New bacteriocin, sakacine G, useful for controlling microbes, particularly *Listeria monocytogenes*, in foods, is derived from *Lactobacillus sakei* 2512

DC D16

IN BERJEAUD J; BERJEAUD J M; CENATIEMPO Y; FREMAUX C; SIMON L

PA (RHOD-C) RHODIA CHIM; (RHOD-C) RHODIA FOOD

CYC 2

PIA FR 2809403 A1 20011130 (200211)\* FR 21[1]

ZA 2002009666 A 20030923 (200368) EN 44

ADT FR 2809403 A1 FR 2000-6859 20000529; ZA 2002009666 A ZA 2002-9666 20021128

PRAI FR 2000-6859 20000529

AN 2002-077302 [11] WPINDEX

CR 2002-077303

AB FR 2809403 A1 UPAB: 20050524

NOVELTY - Isolated polypeptide (I), designated sakacine G, is a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* 2512.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) nucleic acid (II) that encodes (I);
- (2) cloning and/or expression vector containing (II);
- (3) host cell transformed with the vector of (2);
- (4) preparation of recombinant (I) by culturing cells of (3); and
- (5) composition comprising at least one (I) or *L. sakei* 2512.

ACTIVITY - Antibacterial. In a test on bacteria growing in gelled medium, (I) inhibited *Listeria ivanovii* BUG 496; *Listeria innocua* 8811; *Enterococcus durans*; *E. faecalis*; *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus sakei* 2515.

MECHANISM OF ACTION - None given in the source material.

USE - (I) is used to control pathogenic or unwanted microorganisms in food processing (claimed) and (not claimed) in medical, veterinary and cosmetic products, most particularly *Listeria monocytogenes*. (I) may be generated in foods by fermentation with *L. sakei* 2512.

ADVANTAGE - (I) is a particularly effective inhibitor of *Listeria monocytogenes*.

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 809 403**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **00 06859**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : C 07 K 14/335, C 12 N 15/31, 15/63, A 23 L 3/3571, 3/  
3526 // (C 12 N 15/31, C 12 R 1:225)

⑫

## BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ DACTERIOCINE ANTI-LISTERIA.

②② Date de dépôt : 29.05.00.

③③ Priorité :

⑥③ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : RHODIA FOOD Société par actions  
simplifiée — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public  
de la demande : 30.11.01 Bulletin 01/48.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 23.08.02 Bulletin 02/34.

⑦② Inventeur(s) : BERJEAUD JEAN MARC, FREMAUX  
CHRISTOPHE, CENATIEMPO YVES et SIMON  
LAURENCE.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche :

⑦③ Titulaire(s) : RHODIA CHIMIE.

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

FR 2 809 403 - B1



La présente invention concerne une bactériocine de *Lactobacillus sakei* et plus particulièrement de *Lactobacillus sakei* 2512, une séquence nucléotidique codant pour cette bactériocine, et l'utilisation industrielle de cette bactériocine comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.

Les bactéries lactiques sont utilisées intensivement dans les fermentations alimentaires afin, non seulement d'améliorer la saveur et la texture des aliments mais surtout pour allonger leur durée de conservation. De nombreuses bactéries lactiques ont en effet la faculté d'inhiber la croissance de certaines bactéries à Gram positif, dont des souches pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, grâce à l'excrétion de molécules antagonistes, parmi lesquelles des composés peptidiques. Ces composés peptidiques, appelés bactériocines, présentent donc un potentiel intéressant pour la préservation qualitative et sanitaire de produits alimentaires fermentés.

A titre représentatif de ces bactériocines, on peut notamment citer celles formant la sous-classe de polypeptides dénommés bactériocines anti-*Listeria*, bactériocines de classe IIa (Ennahar S. *et al.*, 2000, FEMS Microbiol. Rev., 24:85-106) et cystibiotiques (Jack R. *et al.*, 1995, Microbiol. Rev., 59(2):171-200). Il a été fait récemment état de l'utilisation potentielle d'une de ces bactériocines de classe IIa, la divercine V41, pour empêcher la croissance de *Listeria monocytogenes* dans du saumon fumé (Duffes F. *et al.*, 1999, J. Food Prot., 62(12):1394-1403).

Les séquences de ces polypeptides présentent de fortes similitudes dans leur partie N-terminale, avec en particulier la présence d'un pont disulfure. La partie C-terminale hydrophobe est beaucoup plus variable, toutefois certaines de ces bactériocines, dites de type pédiocine (pédiocine PA-1, entéroline A et divercine V41), se caractérisent par une taille supérieure à 40 résidus et la présence d'un deuxième pont disulfure du côté C-terminal.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence une nouvelle bactériocine de classe IIa produite à partir d'une souche spécifique de

*Lactobacillus sakei*, qui s'avère particulièrement efficace pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*.

En accord avec Tagg J.R. *et al.*, Bacteriol. Rev., 40 ; 722-756 (1976), le terme "Bactériocine" au sens de l'invention fait référence à un polypeptide  
5 produit, par synthèse ribosomique, à partir de microorganismes, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres bactéries.

La présente invention a donc pour premier objet un polypeptide issu de la souche *Lactobacillus sakei* 2512, doté d'une activité bactériocine.

10 La souche *Lactobacillus sakei* 2512 a été déposée le 25 mai 2000 auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes où elle est enregistrée sous le numéro de dépôt I - 2479.

La bactériocine objet de la présente invention a été dénommée Sakacine G. Il s'agit d'un polypeptide possédant une masse moléculaire de l'ordre de 3700  
15 à 3900 et préférentiellement d'environ 3834 Da déterminée par spectrométrie de masse. Elle possède un spectre d'inhibition bactérienne très apparenté à celui des bactériocines de classe IIa. C'est ainsi qu'elle s'avère particulièrement efficace contre les souches de *Lactobacillus sakei* autres que le *Lactobacillus sakei* 2512, *Pediococcus cerevisiae*, l'ensemble des souches *Listeria* et contre les  
20 *Enterococcus faecalis* et *durans*. En revanche, elle s'avère inactive contre les autres espèces de *Lactobacillus* comme par exemple le *Lactobacillus debrueckii*, le *Lactobacillus plantarum*, le *Lactobacillus brevis*, le *Lactobacillus casei*, et une souche d'*Enterococcus faecium*.

A l'image des bactériocines anti-*Listeria* de type pédiocine, la Sakacine  
25 G possède dans sa structure peptidique avantageusement deux ponts disulfures.

Une analyse des déterminants génétiques de plusieurs bactériocines de classe IIa a montré que les gènes impliqués dans leurs production, transport et immunité, sont organisés en une ou plusieurs structures de type opéron. Ces opérons ont une localisation souvent plasmidique et possèdent généralement au  
30 moins deux gènes codant pour des protéines, homologues à un ABC-transporteur

et une protéine accessoire, probablement impliquée dans l'export des bactériocines.

Le clonage du fragment nucléotidique (SEQ ID N° 9) contenant le gène de la Sakacine G a révélé l'existence de deux cadres ouverts de lecture complets  
5 *skgA1* (SEQ ID N°1) et *skgA2* (SEQ ID N°3) et de deux autres tronqués *skgI* (SEQ ID N°5) et *skgD* (SEQ ID N°7) situés aux deux extrémités du fragment cloné dont une représentation schématique est présentée en figure 1.

Les produits des gènes *skgA1* et *skgA2*, appelés pré-bactériocines, peuvent subir une maturation au cours de laquelle leurs peptides leaders respectifs  
10 sont clivés entre les résidus 18 et 19, libérant ainsi la Sakacine G active (résidus 19-55).

La présente invention a donc également pour objet un polypeptide isolé correspondant à une bactériocine, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°2 et/ou la séquence ID N°4. La séquence de la bactériocine mature comprend la  
15 séquence ID N°12.

Le cadre de lecture appelé *skgI* code une protéine de 54 résidus. La comparaison de cette séquence avec celle des banques de données montre de fortes similitudes de *SkGI* avec des protéines dites d'immunité. Elle code vraisemblablement pour la protéine d'immunité protégeant la bactérie productrice  
20 de la Sakacine G.

La présente invention s'étend également à un polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°6 correspondant au cadre de lecture *skgI*.

En ce qui concerne le dernier gène *skgD*, il code pour une portion de protéine qui présente une homologie avec des protéines de la famille des ABC-transporteurs, et plus particulièrement du transporteur de la pédiocine PA-1. Le  
25 gène *skgD* code vraisemblablement pour l'ABC-transporteur spécifique de la Sakacine G.

La présente invention s'étend également au polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°8 correspondant à ce gène dit *skgD*.

30 Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies comme

i) les séquences similaires à au moins 70% de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8 ou N° 12 ; ou

ii) les séquences codées par une séquence d'acide nucléique homologue telle que définie ci-après c'est-à-dire une séquence d'acide nucléique hybridant avec la séquence SEQ ID N° 1, N° 3, N° 5, N° 7 ou N° 9 ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation.

Là encore, le terme "similaires" se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les acides aminés des séquences homologues comparées mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans une séquence polypeptidique prend en compte les substitutions conservatives qui sont des substitutions d'acides aminés de même classe, telles que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

Plus généralement, par "séquence d'acides aminés homologue", on entend donc toute séquence d'acides aminés qui diffère de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8 ou N° 12 par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou d'un nombre réduit d'acides aminés, notamment par substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels ou pseudo-acides aminés à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique du polypeptide isolé et de préférence de la Sakacine G.

De préférence, une telle séquence d'acides aminés homologue est similaire à au moins 85 % de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8 ou N° 12, de préférence au moins 95 %.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the

Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité ou similitude, comme défini plus haut). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces (" gaps ") dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

L'activité biologique du polypeptide isolé et notamment de la Sakacine G se réfère à sa capacité à inhiber la croissance de souches bactériennes indésirables et/ou pathogènes, de préférence de bactéries *Listeria* et plus particulièrement de bactéries *Listeria monocytogenes*.

La présente invention a également pour objet un acide nucléique isolé, codant pour un polypeptide tel que défini précédemment.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un acide nucléique isolé comprenant la séquence ID N°1 et/ou la séquence ID N°3.

La séquence nucléotidique complète de la région impliquée dans l'expression de la Sakacine G (2042 pb) a été déterminée, et est représentée en séquence ID N°9. La présente invention vise également un acide nucléique comprenant une telle séquence.

Comme décrit précédemment, cette séquence possède deux cadres ouverts de lecture complets *skgA1* et *skgA2* et de deux autres tronqués, *skgI* et *skgD* situés aux deux extrémités du fragment cloné. Les gènes supposés *skgA1* (SEQ ID N°1), *skgA2* (SEQ ID N°3) et *skgI* (SEQ ID N°5) y sont orientés en sens inverse par rapport à *skgD* (SEQ ID N°7).

Sont également revendiqués dans le cadre de la présente invention, l'acide nucléique comprenant la séquence ID N°5 ainsi que l'acide nucléique comprenant la séquence ID N°7.

Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies comme :

i) des séquences similaires à au moins 70 % de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 ; ou

ii) des séquences hybridant avec la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 ou leur séquence complémentaire, dans des conditions  
5 stringentes d'hybridation, ou

iii) des séquences codant pour le polypeptide dénommé Sakacine G, tel que défini précédemment.

De préférence, une séquence nucléotidique homologue selon l'invention est similaire à au moins 75 % des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9,  
10 de préférence encore au moins 85 %, ou au moins 90 %.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle  
15 50% des brins appariés se séparent ( $T_m$ ).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases,  $T_m$  est définie par la relation (Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory) :

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \text{ Log}(\text{concentration en cations}) - 0,63(\%\text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$$

20 Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases,  $T_m$  est définie par la relation :

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation peut être de préférence  
25 de 5 à 10°C en dessous de  $T_m$ , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

Le terme "séquences similaires" employé plus haut se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les nucléotides comparés mais aussi à la  
30 ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans les séquences nucléiques distingue par exemple les purines et les



pyrimidines.

Une séquence nucléotidique homologue aux cadres ouverts de lecture représentés en SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 inclut donc toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 par  
5 mutation, insertion, délétion ou substitution d'une ou plusieurs bases, ou par la dégradation du code génétique, pour autant qu'elle code pour un polypeptide présentant l'activité biologique de la Sakacine G, comme définie ci-après.

Parmi de telles séquences homologues, sont comprises les séquences des gènes de bactéries autres que *Lactobacillus*, codant pour la Sakacine G.

10 Les polypeptides de la présente invention peuvent être synthétisés par toutes les méthodes bien connues de l'homme du métier. Les polypeptides de l'invention peuvent par exemple être synthétisés par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires  
15 non désirés et pour sa facilité de production.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique conforme à la présente invention est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide  
20 conforme à la présente invention ou d'un polypeptide codé par une séquence d'acide nucléique conforme à la présente invention.

La bactériocine recombinante peut également être produite par un procédé, dans lequel un vecteur contenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique conforme à l'invention et de préférence les séquences  
25 SEQ ID N°1 et/ou N°3 où une séquence homologue est transférée dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression du polypeptide correspondant. La protéine produite peut ensuite être récupérée et purifiée. Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant obtenu peut être purifié à partir de lysats et extraits  
30 cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de

chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

La séquence d'acide nucléique d'intérêt, codant pour la Sakacine G, peut  
5 être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle est liée de manière  
opérante à des éléments permettant la régulation de son expression, tels que  
notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription. Les  
signaux contrôlant l'expression des séquences nucléotidiques (promoteurs,  
10 activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte  
cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention  
peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte  
choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés  
selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en  
15 résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes  
standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate  
de calcium.

Les vecteurs de clonage et/ou d'expression tels que décrits ci-dessus,  
contenant une séquence nucléotidique définie selon l'invention font également  
20 partie de la présente invention.

L'invention vise en outre les cellules hôtes transformées, de manière  
transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être  
obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, de préférence procaryotes,  
d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis  
25 la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication  
et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transférée.

Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des bactéries telles  
que *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*,  
*Escherichia* et les levures.

30 Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine  
artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par

criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, et/ou N°7 ou N°9. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

5 Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

10 La présente invention se rapporte également à un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes* dans un environnement qui peut être alimentaire ou non et qui est susceptible d'être contaminé avec les *Listeria monocytogenes*.

15 Les *Listeria monocytogenes* sont des microorganismes pathogènes qui sont à l'origine de sévères maladies chez les êtres humains et animaux et qui peuvent notamment être facilement transmissibles par des aliments contaminés, plus spécialement au moyen de viandes, de produits carnés, de produits marins, de lait et de produits dérivés. La présente invention propose donc un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* dans un aliment susceptible de  
20 contenir des *Listeria monocytogenes* à titre de contaminant, ledit procédé comprenant l'addition d'un polypeptide conforme à l'invention dans ledit aliment en une quantité suffisante pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes*.

25 Les bactériocines conformes à l'invention sont de préférence utilisées dans tout système alimentaire en une quantité comprise entre 1 et 100000 unités arbitraires (AU) de bactériocines par gramme d'aliment.

Une AU de bactériocines est définie comme 5 µl de la dilution la plus élevée du surnageant de culture conduisant à une zone définie d'inhibition de croissance par rapport à une souche témoin d'une bactérie à Gram positif sur un milieu agar.

30 Bien que les aliments soient les plus concernés par une contamination par *Listeria monocytogenes*, les produits vétérinaires et médicaux peuvent également

être contaminés avec ce type de bactéries, de même que les produits cosmétiques ou produits apparentés.

Les bactériocines conformes à la présente invention, et notamment la Sakacine G, sont donc également utiles pour inhiber la croissance de ce type de pathogènes dans ces produits.

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'une bactériocine conforme à la présente invention comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables notamment dans la préparation de produits alimentaires et plus précisément pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans les produits alimentaires.

Le polypeptide peut être incorporé tel quel dans le produit alimentaire considéré ou encore y être produit à partir de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

La présente invention a ainsi également pour objet l'utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 dans un produit alimentaire pour y générer un polypeptide bactériocine conforme à l'invention.

L'invention concerne encore une composition bactériocine, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide conforme à la présente invention, c'est-à-dire issue de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 ou comprenant la séquence SEQ ID N°2, ou N°4, ou N°12 ou la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

L'invention s'étend également à l'utilisation de la souche *Lactobacillus sakei* 2512 destinée à produire un polypeptide tel que défini plus haut, pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans des produits alimentaires ainsi que les compositions comportant de telle souche.

Les exemples et la figure ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de l'objet de la présente invention.

## FIGURE :

Figure 1 : Représentation schématique du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine G.

5

## MATERIELS ET METHODES

• Souches bactériennes et milieux de culture. *Lactobacillus sakei* 2512 est cultivée à 30°C en milieu MRS (DIFCO Laboratories) stérilisé 12 min à 110°C. Les souches indicatrices sont cultivées en milieu BHI ("brain-heart infusion"; DIFCO Laboratories) à 37°C.

10

• Test d'activité. Du milieu BHI, gélosé à 10g/l, est ensemencé à 1% par une préculture de souche indicatrice en phase stationnaire avant d'être coulé en boîte de Petri. Cinquante microlitres de solution de sakacine G sont déposés dans des puits creusés dans la gélose refroidie à l'emporte pièce. L'activité bactériocine se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits après incubation une nuit à 37°C.

15

• Analyse protéique. La sakacine G est analysée en spectrométrie de masse sur un appareil Perkin-Elmer Sciex API 165 équipé d'une source d'ionisation par Ionspray. Après lyophilisation, la fraction HPLC active est reprise avec une solution acétonitrile / eau (1:1) contenant 0,1% d'acide formique puis injectée par infusion à un débit de 5 µl/min.

20

La concentration protéique est déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique au moyen du kit BCA (Sigma) selon les instructions du fabricant.

25

Les comparaisons de séquences protéiques sont réalisées grâce au programme BLAST (1), accessible à partir du serveur ExPASy du "Swiss Institute of Bioinformatics".

• Clonage moléculaire et transformation. Les plasmides sont extraits et purifiés à partir de souches d'*Escherichia coli* et de *Lactobacillus sakei* 2512 selon les méthodes décrites précédemment par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold

30

Spring Harbor Laboratory et Muriana et Klaenhammer, 1987, Appl. Environ. Microbiol., 53 :553-560 respectivement.

Les enzymes de restriction et de modification de l'ADN sont utilisées selon les indications du fournisseur (Gibco-BRL). Les électrophorèses en gel  
5 d'agarose, analytique et préparative, sont conduites en tampon Tris/borate/EDTA (pH 8,3) selon les méthodes décrites par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory. Les fragments d'ADN digérés sont purifiés à partir des gels d'agarose en utilisant le kit "Prep-a-Gene" (Bio-Rad). Les clonages dans les plasmides pGEM-T (Promega) et pZERO2 (Invitrogen) sont réalisés selon les  
10 recommandations des fournisseurs. Le transfert de type Southern est réalisé sur membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham) selon Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory. Le transfert est suivi d'une hybridation avec une sonde radioactive obtenue par marquage au  $^{32}\text{P}$  à l'aide du kit "random primers DNA labelling system" (Gibco-BRL). Les bactéries *E. coli* sont rendues  
15 compétentes et transformées selon la méthode de Hanahan, 1983. J. Mol. Biol. 166:557-80.

La Taq polymérase (Gibco-BRL) est utilisée selon les recommandations du fournisseur. L'amplification du fragment d'ADN codant la Sakacine G a été réalisée à l'aide d'un appareil "Geneamp 9700®" (Perkin-Elmer) selon les  
20 conditions suivantes : 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 45°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 1 min suivis d'un cycle supplémentaire d'élongation à 72°C pendant 5 min.

Le fragment d'ADN portant le locus sakacine G est séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique ABI Prism 310® (Perkin-Elmer) en utilisant le kit de  
25 séquençage "Big-dye terminator®" (Perkin-Elmer) et les amorces nucléotidiques appropriées.

#### EXEMPLE 1 :

Isolement et purification de la Sakacine G.

30 Une culture de 16 h de *Lactobacillus sakei* 2512 (100 ml) est centrifugée à 6000g pendant 15 min. Le surnageant de culture est ensuite chauffé à 70°C

pendant 20 min. Le surnageant refroidi est ensuite dilué avec 1 volume d'eau (le pH de la solution diluée doit être inférieur à 6, par addition d'HCl 1M si nécessaire) avant d'être passé sur une colonne (2.5 x 18 cm) contenant une résine échangeuse de cations (carboxy-methyl cellulose; Cellufine C-200, Amicon) 5 équilibrée avec de l'eau. Après des lavages successifs avec de l'eau (100 ml) puis une solution de NaCl 0,1M (150 ml), la Sakacine G est éluée avec une solution de NaCl 0,5M (200 ml). Le pH de toutes les solutions doit être inférieur à 6. La fraction active est ensuite déposée sur cartouche d'extraction en phase solide (Sep-pak plus C18, Waters) équilibrée dans l'eau. Après lavages successifs avec 5 ml de 10 solutions d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 0, 10, 20 et 30% d'acétonitrile, la Sakacine G est éluée avec 10 ml d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 80% d'acétonitrile. Après lyophilisation, l'extrait est solubilisé dans 1 ml de solution aqueuse d'acétonitrile à 40% puis injecté sur une colonne HPLC analytique de phase inverse en C8 (Kromasil, 5µm, 100 Å, 4.6 x 250 mm, A.I.T.). L'HPLC a été 15 réalisée sur un appareillage comprenant une pompe Perkin-Elmer series 200 LC connectée à un détecteur Perkin-Elmer 785A. Le chromatogramme en absorption est enregistré à 220 nm. La séparation est réalisée, à un débit de 0,8 ml/min selon le gradient suivant : Solvant A = eau/acide trifluoroacétique 0,1%; solvant B = acétonitrile/eau/ acide trifluoroacétique 0,07%. Après un lavage de 5 min avec 20 20% de solvant B, l'élution est réalisée par un gradient de 20 de 40% de solvant B en 10 min puis de 40 à 55% de solvant B en 20 min.

La fraction correspondant au pic à 23 min s'étant révélée active contre *Listeria ivanovii* BUG 496 a été analysée en spectrométrie de masse en ionisation "ionspray". La molécule apparaît pure à au moins 95% et possède une masse 25 moléculaire de  $3834,32 \pm 0,31$  Da. La quantité de Sakacine G ainsi purifiée a été estimée à 120 µg à partir de 100 ml de culture. Le rendement de purification a été estimé à 55% d'activité retrouvée. Une partie de la séquence primaire de la Sakacine G a été déterminée par microséquençage et deux oligonucléotides dégénérés ont été établis à partir de cette séquence.

EXEMPLE 2 :

Clonage du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine

G.

- 5 Par génétique inverse, les deux oligonucléotides dégénérés SakG01 (5' AARTATTATGGNAAAYGGNGT 3') (SEQ ID N°10) et SakG02 (5' ACATGATGNCCNCCRTTNGC 3') (SEQ ID N°11) ont été choisis afin d'amplifier le fragment d'ADN correspondant au gène de structure de la Sakacine G mature (SEQ ID N°12) par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).
- 10 L'amplifiat ainsi obtenu, d'une taille approximative de 100 pb a été cloné dans le plasmide pGEM-T pour former le plasmide pJMBYC01. Le fragment de restriction *PvuII* de 560 pb issu de pJMBYC01, incluant le fragment inséré, a servi de sonde d'hybridation, lors d'un transfert de type Southern, pour localiser le gène de structure sur le génome de *Lactobacillus sakei* 2512. A partir d'un extrait
- 15 plasmidique de *Lactobacillus sakei* 2512 digéré par les enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRI*, la sonde a révélé des fragments de tailles respectives d'environ 2,1 et 9 kpb. Le fragment *HindIII* de 2,1 kpb a été purifié puis inséré dans le vecteur pZERO2 pour donner le plasmide pJMBYC02. La présence du gène de structure de la Sakacine G dans pJMBYC02 a été démontrée par amplification
- 20 PCR avec les amorces SakG01 et SakG02 puis par séquençage nucléotidique du fragment inséré dans pJMBYC02.

- La séquence nucléotidique complète (2042 pb) du fragment de restriction *HindIII* inséré dans pJMBYC02 a été déterminée. L'analyse de cette séquence a révélé l'existence de deux cadres ouverts de lecture complets *skgA1* et *skgA2* et de
- 25 deux autres tronqués, *skgI* et *skgD* situés aux deux extrémités du fragment cloné. Les gènes supposés *skgA1* *skgA2* et *skgI* sont orientés en sens inverse par rapport à *skgD*.

- Chacun des cadres ouverts de lecture est précédé d'un site potentiel de fixation des ribosomes. Les gènes *skgA1* et *skgA2* codent tous les deux des
- 30 protéines de 55 résidus d'acides aminés dont les séquences 19-55 sont totalement identiques. La séquence 19-52 correspond à la séquence de la sakacine G obtenue



par microséquençage. La présence supposée de 3 résidus cystéine en positions 9, 14 et 24 est confirmée et trois résidus supplémentaires de glycine, valine et cystéine apparaissent en extrémité C-terminale.

Les séquences 1-18 des protéines SkgA1 et SkgA2 ne diffèrent que de 3  
5 résidus et présentent de fortes similitudes avec les peptides "leader" des bactériocines de classe II, qui sont impliquées dans le transport de ces peptides par des ABC-transporteurs spécifiques. En particulier le motif GG terminal (17-18) est caractéristique de ces séquences leader et constitue le site de maturation de ces bactériocines. La comparaison des séquences nucléotidiques des gènes *skgA1* et  
10 *skgA2* montre également une identité de séquence de plus de 95% pour la partie des gènes codant la bactériocine mature. Le cadre de lecture ouvert incomplet appelé *skgI* code une protéine de 54 résidus. La comparaison de cette séquence avec celles des banques de données montre de fortes homologues de SkgI avec les protéines dites d'immunité LccI et MesI. L'implication de MesI dans la protection  
15 vis à vis de la mésentéricine Y105 a été démontrée. On peut supposer que *skgI* code la protéine d'immunité à la sakacine G.

Le dernier gène *skgD* code une portion de protéine de 394 acides aminés. D'après les banques de données, SkgD est très homologue de protéines de la famille des ABC-transporteurs et plus particulièrement des transporteurs de la  
20 pédiocine PA-1 : PedD ou PapD (Marugg J.D. *et al.*, 1992, Appl. Environ. Microbiol. 58(8):2360-7; Motlagh A. *et al.*, 1994, Lett. Appl. Microbiol. 18(6):305-12), de la sakacine P : SppT (Huhne K. *et al.*, 1996, Microbiology. 142(Pt 6):1437-48), de la sakacine A : SapT (Axelsson L. *et al.*, 1995, J. Bacteriol. 117(8):2125-37) et de la mésentéricine Y105 : MesD (Fremaux C. *et al.*, 1995, Microbiology. 141(Pt 7):1637-45).  
25

### EXEMPLE 3 :

#### Spectre d'inhibition.

La sensibilité à la Sakacine G de 17 souches bactériennes a été testée par  
30 la méthode de test en puits (cf Matériels et Méthodes). Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-après :

TABLEAU I

	Rayon des halos d'inhibition (mm)
<i>Lc. lactis</i> ATCC11454	0
<i>Ln. Paramesenteroides</i> DSM 20288	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20484	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20240	0
<i>Lb. delbrueckii</i> DSM 20081	0
<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174	0
<i>Lb. brevis</i> DSM 20054	0
<i>Lb. casei</i> DSM 20011	0
<i>Lb. sakei</i> 2515	1
<i>P. acidilactici</i> ENSAIA 583	0
<i>P. cerevisiae</i> IP 5492	1
<i>E. faecium</i> ENSAIA 631	0
<i>E. faecalis</i> IP 5430	2
<i>E. faecalis</i> ENSAIA 636	1
<i>E. durans</i> ENSAIA 630	2
<i>L. innocua</i> 8811	3
<i>L. ivanovi</i> BUG 496	6

- 5 Le spectre d'inhibition de cette bactériocine apparaît comme assez étroit et limité aux souches de *Lactobacillus sakei* et *Pediococcus cerevisiae* pour les bactéries lactiques. Ce peptide apparaît, comme les autres bactériocines de classe IIa, actif contre toutes les souches de *Listeria* testées, ainsi que contre les *Enterococcus faecalis* et *durans* mais pas contre *Enterococcus faecium*.

### REVENDECATIONS

1. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine, dénommée Sakacine G, issue de *Lactobacillus sakei* 2512.

5           2. Polypeptide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine de classe IIa.

3. Acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique codant un polypeptide selon la revendication 1 ou 2.

10

4. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon la revendication 3.

5. Cellule hôte transformée par un vecteur selon la revendication 4.

15

6. Cellule hôte selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un microorganisme choisi parmi les *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Escherichia* ou d'une levure.

20

7. Procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique selon la revendication 3 est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture des conditions permettant l'expression d'un polypeptide selon la revendication 1 ou 2.

25

8. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.

30

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit polypeptide est mis en œuvre pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans les produits alimentaires.

10. Utilisation selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce que ledit polypeptide est produit dans le produit alimentaire à partir de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

5

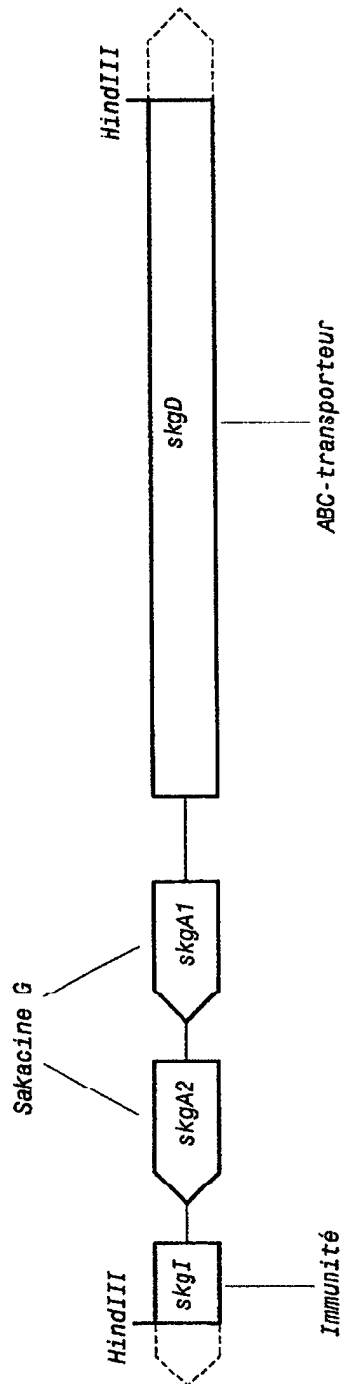
11. Utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 dans des produits alimentaires pour y produire un polypeptide bactériocine selon la revendication 1 ou 2.

10

12. Composition bactériocine caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 ou la souche de *Lactobacillus Sakei* 2512.

2809403

1/1



# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☐ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

N° d'enregistrement national : 00 06859

N° de publication :

2809403

<b>1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION</b>	
<b>Référence des documents</b> (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	<b>Revendications du brevet concernées</b>
NEANT	
<b>2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL</b>	
<p>HUGAS M ET AL: "Application of the bacteriocinogenic <i>Lactobacillus sakei</i> CTC494 to prevent growth of <i>Listeria</i> in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres" <i>FOOD MICROBIOL.</i>, vol. 15, 1998, pages 639-650, XP000982835 ISSN: 0021-8847</p> <p>AXELSSON L ET AL: "THE GENES INVOLVED IN PRODUCTION OF AND IMMUNITY TO SAKACIN A, A BACTERIOCIN FROM <i>LACTOBACILLUS SAKAI</i> LB706" <i>JOURNAL OF BACTERIOLOGY</i>, US, WASHINGTON, DC, vol. 177, no. 8, 1 avril 1995 (1995-04-01), pages 2125-2137, XP000673873 ISSN: 0021-9193</p> <p>HUEHNE KATHRIN ET AL: "Analysis of the sakacin P gene cluster from <i>Lactobacillus sake</i> Lb674 and its expression in sakacin-negative <i>Lb. sake</i> strains." <i>MICROBIOLOGY (READING)</i>, vol. 142, no. 6, 1996, pages 1437-1448, XP000982832 ISSN: 1350-0872</p>	
<b>3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES</b>	
<b>Référence des documents</b> (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	<b>Revendications du brevet concernées</b>
NEANT	